

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

A DE 155 050 70
D5



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : <u>A61L 27/00</u>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/25185
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	22. August 1996 (22.08.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/00608 (22) Internationales Anmeldedatum: 13. Februar 1996 (13.02.96) (30) Prioritätsdaten: 195 05 070.3 15. Februar 1995 (15.02.95) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: HAVERICH, Axel [DE/DE]; Am Butterberg 26, D-24113 Molfsee (DE). STEINHOFF, Gustav [DE/DE]; Platenstrasse 17, D-24211 Preetz (DE). KELM, Sörge [DE/DE]; Dorfstrasse 14, D-24146 Kiel (DE). WALLUSCHECK, Knut, Peer [DE/DE]; Kührer Strasse 102, D-24211 Preetz (DE). (74) Anwälte: STRASSE, Joachim usw.; Balanstrasse 55, D-81541 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: ARTIFICIAL VESSEL SYSTEMS AND PROCESS FOR PRODUCING THEM (54) Bezeichnung: KÜNSTLICHE GEFÄSSSYSTEME UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG (57) Abstract <p>The invention relates to an artificial blood vessel system with an internal surface coating. As against prior art systems, the artificial blood vessel system of the invention has increased cell adhesion and retention, especially of endothelial cells. The invention also relates to a process for producing an artificial vessel system in which a two-component coating is applied to the inner surface of the vessels in two steps. The first component is macromolecular and contains more than one primary amino group. The preferred macromolecular component is poly-L-lysine hydrobromide. The second component, which is added in process step b), contains at least two active groups, including at least one aldehyde group. It is of special advantage here to use glutaric dialdehyde. The third component comprises an oligo saccharide, oligo peptide or oligo protein containing an arginine-glycine asparagine (RGD) sequence which especially increases the fixing of endothelial cells.</p> <p>(57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein künstliches Blutgefäßsystem mit einer inneren Oberflächenbeschichtung. Das erfindungsgemäße künstliche Blutgefäßsystem weist gegenüber dem Stand der Technik eine erhöhte Zellenadhäsion und -retention, insbesondere von Endothelzellen auf. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines künstlichen Gefäßsystems. In diesem Verfahren wird auf die innere Gefäßoberfläche in zwei Verfahrensschritten eine Zwei-Komponenten-Beschichtung aufgebracht. Die erste Komponente ist makromolekular und enthält mehr als eine primäre Aminogruppe. Vorzugsweise wird als makromolekulare Komponente Poly-L-lysin-hydrobromid verwendet. Die zweite Komponente, die im Verfahrensschritt b) zugegeben wird, enthält mindestens zwei aktive Gruppen, davon mindestens eine Aldehydgruppe. Besonders vorteilhaft ist hierbei die Verwendung von Glutardialdehyd. Die dritte Komponente umfaßt ein Oligosaccharid, -peptid oder -protein, das eine Arginin-Glycin-Asparagin (RGD)-Sequenz enthält, die insbesondere die Anlagerung von Endothelzellen erhöht.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LX	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Künstliche Gefäßsysteme und Verfahren zu ihrer Herstellung

(Die Erfindung betrifft ein künstliches Blutgefäßsystem, auf dessen vorbeschichteten Oberflächen eine Substanz mit Zelladhäsion aufgebracht ist.

5 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung des künstlichen Gefäßsystems, in welchem die innere Oberfläche des Gefäßsystems vorbeschichtet und in einem weiteren Verfahrensschritt eine Substanz aufgebracht wird, die von bestimmten Zelladhäsionsrezeptoren gebunden wird.

10

(Die chemische und physikalische Zusammensetzung von künstlichen Gefäßsystemen wird stetig weiterentwickelt und verbessert, da autologe Gefäßsysteme als Ersatz für natürliche Gefäßsysteme nur beschränkt verfügbar sind. Bei den Gefäßsystemen ist insbesondere die innere Oberfläche, die zahlreiche mechanische und metabolische Eigenschaften aktiviert, von entscheidender Bedeutung. Dies gilt ganz besonders für künstliche Blutgefäßsysteme, denn die innere Oberfläche dieser Gefäßsysteme ist entscheidend für den störungsfreien Blutfluß und die Blutgerinnung.

20

So kann der Einsatz unbehandelter, synthetischer Gefäßtransplantate, die insbesondere in der Herz- und Gefäßchirurgie als Blutgefäßersatz verwendet werden, bei den Patienten einen Verschuß der Gefäßsysteme verursachen, die zu den bekannten, mög-

licherweise auch letalen Konsequenzen, beispielsweise zu einem Schlaganfall, führen können.

5 Um derartige Störungen bei künstlichen Gefäßsystemen zu vermeiden, muß die innere Oberfläche entsprechend vorbehandelt werden. So werden bei künstlichen Gefäßprothesen Endothelzellen (EC) in das Innere des Systems eingebracht. Die Anlagerung einer natürlichen Endothelzellschicht an den Innenwänden der künstlichen Gefäßsysteme verringert die Gefahr einer Thrombose und somit die Verschlußrate der Kunstprothese.

10 Ein wesentlicher Nachteil besteht jedoch darin, daß die Adhäsion von Zellen, insbesondere von Endothelzellen an die Innenwände der synthetischen Materialien sehr gering ist. Die Endothelzellenbesiedlung an den Innenwänden wird jedoch gefördert wenn dort vorher eine Substanz aufgebracht wird, die die gewünschte Zelladhäsion erhöht. Diese Substanzen werden dann von den Rezeptoren der Zellen, die angesiedelt werden sollen, erkannt und gebunden. Bezüglich der Endothelzellenadhäsion bei künstlichen Blutgefäßen sind verschiedene Verfahren bekannt die diese Adhäsion an den Innenwänden des Gefäßsystems verbessern. Die innere Oberfläche dieser synthetischen Blutgefäßsysteme wird z.B. unter Verwendung verschiedener Matrixproteine zunächst vorbeschichtet.

25 Als Vorbeschichtungssubstanzen sind insbesondere Plasmaproteine wie Collagen und Laminin bekannt, die eine Adhäsion der Endothelzellen verbessern. Fibronectin, das auf PTFE-Oberfläche aufgebracht wird, gilt als die Haupterfolgssubstanz der Zelladhäsion.

30 Sank et al. offenbaren ein Verfahren, in dem PTFE-Transplantat zunächst entweder mit Plasmaproteinen wie Gelatine, Laminin, Fibronectin und Collagen oder mit Peptiden, die eine RGD

Sequenz enthalten, direkt beschichtet werden. Anschließend erfolgt die Besiedelung mit Endothelzellen (Sank et al., Am J Surg 1992, Nr. 164, Seiten 199-204).

5 In der europäischen Patentanmeldung EP 0 531 547 A1 wird ein künstliches Blutgefäßsystem beschrieben, das mit einem Plasma-
protein, das Endothelzellenadhäsion aufweist, beschichtet wird. Die verwendeten Proteine sind Collagen, Gelatin, Laminin und
10 Fibronektin. Das Plasmaprotein wird an die Innenwände des synthetischen Materials des Gefäßsystems über funktionelle Hydroxid-, Carboxyl-Epoxy- oder Aminogruppen kovalent gebunden.

15 Auf diesen derart vorbeschichteten Innenwänden können dann Endothelzellen angesiedelt werden.

Einige dieser aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren weisen jedoch erhebliche Nachteile auf.

20 So steht eine komplizierte und langanhaltende Vorbeschichtung, die vor der Zellbesiedlung stattfindet, einer klinischen Anwendung in breitem Umfang entgegen. Eine mögliche Übertragung von Virusinfektionen, die beispielsweise durch eine Vorbeschichtung mit Humanplasmakomponenten, wie Fibrinkleber, er-
25 folgen kann, sollte ebenfalls vermieden werden. Darüber hinaus ist eine intravaskuläre Anwendung der Plasmaproteine Thrombin und Fibrin hochgradig thrombogen und fördert möglicherweise eine Koagulation, sofern eine Endothelzellenmonoschicht nicht sofort nach der Endothelzellenbesiedlung erzielt werden kann.
30 Die bekannten Verfahren werden hauptsächlich verwendet, um Oberflächen aus Polytetrafluorethylen (PTFE) zu beschichten. Die Beschichtung von Oberflächen aus Dacron und Polyurethan wurde auch, wenn auch seltener, durchgeführt.

35 Die Adhäsion von Endothelzellen an Fibronektin und auch an Laminin und Tenascin ist auf eine Aminosäuresequenz zurückzu-

führen, die in diesen Plasmaproteinen enthalten ist. Diese Substanz ist ein Peptid, das eine Arginin-Glycin-Asparagin (RGD) Aminosäuresequenz enthält. Eine Substanz, die mindestens ein Arginin-Glycin-Asparagin-Aminosäuresequenz enthält, wird i
5 folgenden RGD-enthaltende Substanz genannt. Diese Sequenz wird von Integrinrezeptoren der Endothelzelle und anderen Zelle erkannt (Takemoto et al., ASAIO Transactions 1989; Nr. 35 Seiten 354-356).

10 Gegenüber den natürlich vorkommenden Sequenzen in Plasmaproteinen wird jedoch die Zellenhaftung durch synthetische, RGD-enthaltende Peptide erhöht. Dies wird auf die gegenüber den natürlichen Sequenzen unterschiedlichen Strukturen der synthetischen Peptide zurückgeführt. Darüber hinaus können synthetische, RGD-enthaltende Peptide für Zellrezeptoren selektive
15 sein als Peptide, die den natürlichen Sequenzen extrazelluläre Matrixproteine entsprechen. Substanzen, die eine RGD-Sequenz enthalten, werden von verschiedenen Zellrezeptoren, insbesondere von Endothelzellrezeptoren, erkannt und gebunden.

20 Wird die RGD-enthaltende Substanz direkt auf die synthetische innere Gefäßoberfläche gebracht, so erfolgt nur eine zufällige unspezifische und unvollständige Bindung der RGD-enthaltenden Substanz an das synthetische Material. Dies hat zur Folge, daß
25 die Dichte der RGD-Sequenzen an den Innenwänden des Gefäßsystems sehr gering ist. Diese geringe Dichte hat wiederum nur eine geringe Zellenbesiedlung zur Folge. Ein störungsfreier Durchfluß durch das künstliche Gefäßsystem kann nicht gewährleistet werden. Die direkte Beschichtung der Gefäßoberfläche
30 mit einer RGD-enthaltenden Substanz ist daher sowohl für die Zellenadhäsion und -retention als auch für die daraus resultierenden metabolischen Eigenschaften des künstlichen Gefäßsystems als nicht optimal anzusehen.

35 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein künstliches Blutgefäßsystem zur Verfügung zu stellen, in welchem die

Adhäsion und Retention von Zellen, insbesondere von Endothelzellen, gesteigert und verbessert wird. Der Einsatz derartiger künstlicher Blutgefäßsysteme bewirkt einen störungsfreien Blutfluß, wodurch die Thrombosegefahr verringert und somit die Verschlußrate der künstlichen Gefäßprothese gesenkt wird.

Weiterhin ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung eines künstlichen Gefäßsystems zur Verfügung zu stellen, das zu einer deutlichen Erhöhung der Adhäsion und Retention von Zellen an der Innenwand der Gefäßsysteme und damit zu einer Verbesserung der metabolischen Eigenschaften der künstlichen Gefäßsysteme führt.

Zur Lösung dieser Aufgabe dienen die Merkmale der unabhängigen Ansprüche.

Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den Unteransprüchen definiert.

Das künstliche Blutgefäßsystem besteht aus einem synthetischen Material, wie Polytetrafluorethylen (PTFE), Polyurethan, Silicon und dergleichen. Die erfindungsgemäßen künstlichen Blutgefäßsysteme enthalten eine innere vorbeschichtete Oberfläche, auf die eine Substanz mit Zellenadhäsionseigenschaften aufgebracht ist. Die Beschichtung der inneren Oberfläche umfaßt zwei miteinander umgesetzte Komponenten, nämlich eine erste makromolekulare Komponente mit mehr als einer primären Aminogruppe, und eine zweite Komponente, die mindestens zwei reaktive Gruppen, davon mindestens eine Aldehydgruppe aufweist. Besonders geeignet ist die Verwendung eines Poly-lysin-hydrohalogenids, vorzugsweise ein Poly-L-hydrohalogenid und insbesondere ein Poly-L-lysin-hydrobromid. Vorzugsweise wird Glutardialdehyd als zweite Komponente eingesetzt. Die auf der vorbeschichteten, inneren Oberfläche aufgebrachte Substanz, die die Zellenadhäsion fördert, ist ein Oligosaccharid, -peptid oder -protein. Diese Substanzen weisen mindestens eine RGD-

Sequenz auf. Über diese RGD-Sequenz werden Zellrezeptoren, insbesondere Endothelzellrezeptoren gebunden.

5 Die erfindungsgemäßen künstlichen Blutgefäße bewirken gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten künstlichen Blutgefäßsystemen eine erhöhte Zellenbesiedlung und -retention aufgrund der hohen Dichte der adhäsionsfördernden Substanzen. Dadurch verläuft der Blutfluß und die Blutgerinnung störungsfrei. Nachteilige Auswirkungen, z.B. ein Verschluß der künstlichen Blutgefäßsysteme, werden wirksam vermieden.

15 Aufgrund der erhöhten Zellenadhäsion und -retention eignet sich insbesondere das erfindungsgemäße künstliche Blutgefäßsystem als Ersatz für natürliche arterielle Gefäßsysteme. Die erfindungsgemäßen künstlichen Gefäßsysteme eignen sich insbesondere in der Herz- und Gefäßchirurgie als Ersatz für natürliche Gefäßsysteme.

20 Diese künstlichen Blutgefäßsysteme können beispielsweise unter Verwendung des erfinderischen Verfahrens - wie im folgenden beschrieben - hergestellt werden.

25 Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung eines künstlichen Gefäßsystems bestehend aus einem synthetischen Material, in dem die innere Oberfläche vorbeschichtet wird und anschließend eine Substanz aufgebracht wird, die von Zelladhäsionsrezeptoren erkannt und gebunden wird, umfaßt die folgende Verfahrensschritte:

- 30 a) Das künstliche Gefäßsystem wird in einem ersten Verfahrensschritt mit einer makromolekularen Komponente beschichtet, die mehr als eine primäre Aminogruppe aufweisen muß.
- 35 b) In einem zweiten Verfahrensschritt wird die primäre Aminogruppen enthaltende, makromolekulare Komponente mit einer

zweiten Komponente umgesetzt, die mindestens zwei reaktive Gruppen, davon mindestens eine Aldehydgruppe, enthält.

- 5 c) Das durch die Schritte a) und b) vorbeschichtete, künstliche Gefäßsystem wird mit einer Substanz umgesetzt, die von bestimmten Zellrezeptoren erkannt und gebunden wird.

Vorwiegend besteht das erfindungsgemäße künstliche Gefäßsystem aus einem synthetischen Material, wie Polytetrafluorethylen (PTFE), Polyurethan, Silicon und dgl. Im Verfahrensschritt a) wird die Innenwand des künstlichen Gefäßsystems mit der ersten makromolekularen Komponente beschichtet. Ein wesentlicher Aspekt des erfinderischen Verfahrens ist, daß die primären Aminogruppen der makromolekularen Komponente des Verfahrensschrittes a) in Seitenketten angeordnet sind. Vorzugsweise wird als makromolekulare Komponente Poly-lysin-hydrohalogenid, insbesondere Poly-L-lysin-hydrohalogenid, verwendet. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung von Poly-L-lysin-hydrobromid.

20 Im Verfahrensschritt b) wird diese makromolekulare Komponente mit einer zweiten Komponente umgesetzt, wobei die zweite Komponente in einer molaren Menge verwendet wird, die geeignet ist, sämtliche primären Aminogruppen der ersten Komponente zu funktionalisieren. Besonders vorteilhaft ist hierbei die Verwendung von Glutardialdehyd. Das künstliche Gefäßsystem wird durch die Verfahrensschritte a) und b) innenseitig beschichtet. Nachdem die Vorbeschichtung der inneren Oberfläche erfolgt ist, wird im Verfahrensschritt c) wahlweise ein Peptid, Saccharid oder Protein, auf die beschichtete Oberfläche aufgebracht, das die Zelladhäsion und -retention der gewünschten Zellen bewirkt. Diese Substanz kann ein Oligopeptid, -saccharid oder -protein sein. Sie muß wenigstens eine reaktive Gruppe enthalten, die mit dem derivatisierten Beschichtungsmaterial reagieren kann, z.B. primäre Aminogruppen.

35

Die Verfahrensschritte a) und b) führen zu einer Beschichtung

der künstlichen Gefäßinnenwände, die aus zwei Komponenten besteht. Hierbei hat sich gezeigt, daß die zweite Komponente der Beschichtung, die mindestens zwei reaktive Gruppen und davon mindestens eine Aldehydgruppe enthält, für die Erfindung besonders bedeutungsvoll ist. Diese Komponente wirkt als Abstandshalter (spacer) zwischen der inneren Oberfläche des Gefäßsystems und den Zellrezeptoren der Zellen, die auf der Oberfläche angesiedelt werden. Die Zwei-Komponenten-Beschichtung bewirkt eine gezielte Orientierung und Bindung der die Zelladhäsion bewirkenden Substanzen; denn über die im gleichen Abstand voneinander entfernten, regelmäßig angeordneten primären NH_2 -Gruppen der ersten Komponente erfolgt die gezielte Bindung der zweiten Komponente, die vorzugsweise ein Glutardialdehyd darstellt. Das Glutardialdehyd wird über die ersten Aldehydfunktionen an die primären Aminogruppen des mit Poly-lysin-hydrohalogenid, insbesondere mit Poly-L-lysin-hydrobromid, vorbeschichteten künstlichen Gefäßsystems gebunden. Anschließend wird das vorbeschichtete Gefäßsystem mit einer Substanz umgesetzt, die eine spezifische Adhäsion gegenüber den Zellen aufweist, die angesiedelt werden sollen. Oligosaccharide, -peptide oder -proteine, die beispielsweise eine RGD-Sequenz enthalten, sind für die Adhäsion und Retention von Endothelzellen und anderen Zellen besonders geeignet. Die frei verfügbaren Aldehydfunktionen der Zwei-Komponenten-Beschichtung, die insbesondere von einem derivatisierten Poly-lysin bereitgestellt werden können, binden beispielsweise primäre Aminogruppen der verwendeten spezifische Zelladhäsionsaufweisende Substanzen. Der Beschichtungsmechanismus des erfindungsgemäßen Verfahrens ist in den Figuren 1 a) bis c) wie dargegeben.

Aufgrund des erfinderischen Verfahrens erfolgt keine zufällige und unkoordinierte Bindung der die Zelladhäsion fördernden Substanzen, insbesondere der RGD-Peptide oder Proteine. Die Bindung dieser Substanzen an die synthetischen Innenwände wird gezielt über die in regelmäßigen Abständen angeordneten

Aldehydfunktionen der zweiten Beschichtungskomponenten erreicht. Die dadurch resultierende größere Dichte und Beständigkeit der biologisch aktiven Peptide oder Proteine führt gleichzeitig zu einer Steigerung der Zellenbesiedlung und Zellenretention. Die erhöhte Zellenbesiedlung an den Gefäßinnenwänden wirkt einem Verschluß des Gefäßsystems entgegen. Die metabolischen Eigenschaften der künstlichen Gefäßsysteme werden erheblich verbessert.

10

Das folgende Ausführungsbeispiel erläutert die Erfindung, ohne sie jedoch einzuschränken.

15

Ausführungsbeispiel

1. Herstellung des künstlichen Gefäßsystems

20

25

30

35

Das PTFE-Transplantat ($n = 5$) wird im Verfahrensschritt a) mit 40 $\mu\text{m/ml}$ Poly-L-lysin-hydrobromid (Sigma GmbH, Deisenhofen, BRD) in PBS (phosphat-gepufferte Salzlösung) gefüllt und bei Raumtemperatur 24 Stunden lang inkubiert, um eine Adsorption des Polypeptids am PTFE-Material zu ermöglichen. Nach dem Spülen des Transplantats mit PBS wird im Verfahrensschritt b) eine Lösung von 0,2 % Glutardialdehyd (Sigma GmbH, Deisenhofen, BRD) in PBS in die Transplantate instilliert und 10 Minuten stehengelassen. Das Transplantat wird erneut mit PBS gespült. Das derartig vorbeschichtete Transplantat wird im Verfahrensschritt c) vollständig mit 100 $\mu\text{g/ml}$ eines synthetischen, die Adhäsion von Endothelzellen fördernden Peptids in PBS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys) (Gibco, Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA), das die RGD-Sequenz enthält, gefüllt und 60 Minuten lang stehen gelassen. Nach Entfernen der Peptidlösung wird eine Lösung mit 1 % Rinderserumalbumin (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) in PBS in die Transplantate 30 Minuten lang eingebracht, um mögliche ungebundene Aldehydstellen zu besetzen.

Anschließend wird das Transplantat mit PBS gewaschen.

2. Endothelzellenbesiedlung

- 5 Auf dem RGD-Peptid-beschichteten Gefäßsystem wird eine Endothelzellenkultur angelegt, die aus einer Oberflächenvene z.B. aus der Saphene eines Erwachsenen (AHSVEC), gewonnen wird. Endothelzellen der zweiten bis dritten Kulturpassage werden mit Trypsin behandelt, zentrifugiert und im vollständigen Nährmedium resuspendiert. Ein aliquoter Teil wird zur Zellzählung
10 in einem Hemocytometer verwendet und die Zellsuspension auf eine Zelldichte von $1,2 \times 10^5$ Endothelzellen/cm² eingestellt, um die verfügbare Prothesenoberfläche von 6,3 cm² zu bedecken. Das Transplantat wird mittels einer Spritze mit der Endothelzellensuspension gefüllt, an beiden Enden verschlossen und
15 Minuten lang in einem befeuchteten Inkubator in einer Atmosphäre aus 5 % Kohlendioxid/95 % Luft bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Nach 15 Minuten werden die Transplantatsegmente einmal um 180 ° gedreht. Am Ende des Besiedlungsvorgangs werden
20 die Transplantate mit dem Nährmedium gespült.

Vergleichsversuche

- Es wurde ein Vergleich der Endothelzellenadhäsion und -retention auf unbeschichteten, mit Plasmaproteinen beschichteten
25 erfindungsgemäß beschichteten und mit Polylysin/Glutardialdehyd (ohne RGD) beschichteten PTFE-Gefäßsystemen durchgeführt.

- Die Gruppe 1 stellt ein unbeschichtetes PTFE-Gefäßsystem dar
30 Ein mit Humanfibronectin beschichtetes PTFE-Transplantat wird als Gruppe 2 bezeichnet. Die Vergleichsgruppen 1 und 2 sind nach den aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren hergestellt worden.

- 35 Gruppe 3 ist ein erfindungsgemäßes vorbeschichtetes Blutgefäßsystem, das wie im Ausführungsbeispiel beschrieben hergestellt

wurde.

Gruppe 4 ist ein vorbeschichtetes Blutgefäßsystem, das gemäß den erfindungsgemäßen Verfahrensschritten a) und b) hergestellt wurde. Eine RGD enthaltende Substanz mit Zelladhäsion ist jedoch nicht vorhanden.

Bei den Versuchen zur Bestimmung der Endothelzellenadhäsion und -retention an den Gefäßinnenwänden vor und nach Perfusion der PTFE-Gefäßsysteme der Gruppe 1, 2, 3 und 4 wurden mit Endothelzellen besiedelt. Am Ende des Besiedlungsvorganges wurden die Transplantate der Gruppen 1, 2, 3 und 4 kurz mit Nährmedium gespült. Anschließend wurde jeweils ein Luer-Verbindungsstück entfernt und ein definiertes Segment einer Länge von 1 cm der Gruppen 1, 2, 3 und 4 für eine Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop (REM) präpariert.

Dann wurden die Luer-Verbindungsstücke ersetzt, und die Transplantate in einen künstlichen Strömungskreislauf eingesetzt, um den Widerstand gegen Scherspannung sowie die Zellretention einer angelegten Endothelzellensaat auf den PTFE-Oberflächen zu bestimmen (siehe Figur 2). Ein pulsierender Fluß wurde unter Verwendung einer Walzenpumpe (Medax, Kiel, BRD) eines Kardiotomiebehälters, ausgestattet mit einem Perfusionsmediumfilter und einem Luftblasenfilter (Sorin Biomedica, Saluggia, Italien) und eines extrakorporalen Standard-Perfusionsschlauches (Jostra, Hirrlingen, BRD) in einem geschlossenen, sterilen System erzeugt. Die mit einer Zellkultur versehenen PTFE-Transplantate, die in einem speziell entwickelten Glasrohr eingeschlossen waren, wurden über die vorher eingefügten Luer-Verbindungsstücke in den Kreislauf integriert. Das System wurde mit 500 ml Nährmedium M-199, 10 % Humanserum und Antibiotika gefüllt. Dem Perfusionsmedium wurden keine Endothelzellenwachstumsfaktoren zugegeben und die Temperatur wurde während der Durchführung mittels eines Wasserbades auf 37 °C gehalten. Vor der Verwendung des Systems wurde das

Perfusionsmedium bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂/95 %
Raumluft inkubiert. Der Druck wurde eingestellt und konstant
auf 35 / 5 mm Quecksilber (Hg) gehalten, was 30 Pulsierungen
pro Minute ergab. Gemessen wurde der Druck mit einem Membran-
5 meßwandler und einem Druckmonitor (Hewlett Packard, Andover
USA). Die Geschwindigkeit des Strömungskreislaufs betrug 10
ml/Minute, die eine Stunde lang beibehalten wurde. Nach der
Perfusion wurden beide Luer-Verbindungsstücke aus den je-
weiligen Transplantaten der Gruppen 1, 2, 3 und 4 entfernt, ein
10 bestimmtes Transplantat-Segment herausgeschnitten und für die
Rasterelektronenmikroskopie präpariert.

Zur Präparierung der entnommenen Transplantat-Segmente für die
Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden folgende Schritte
15 unternommen:

1 cm lange Proben von durchströmten Transplantaten enthaltend
die Zellsaat werden mittels Rasterelektronenmikroskopie be-
züglich ihrer Quantifizierung und Morphologie untersucht.

20 Gleich nach der Präparierung aus den künstlichen Gefäßsystemen
werden die Proben mindestens 4 Stunden lang in 3,5 % Glutar-
dialdehyd fixiert und mit Phosphatpufferlösung gespült. An-
schließend erfolgt eine Nachfixierung von 2 Stunden in 2
25 Osmiumtetroxid in Pufferlösung. Nach Dehydratisierung mit
verschiedener Ethanollösungen werden die Proben mit flüssigem
CO₂ bis zu ihrem kritischen Punkt getrocknet, in einem Vakuum-
verdampfer mit Gold/Palladium sputterbeschichtet und mit einem
Rasterelektronenmikroskop (Philips XL 20, Kassel, BRD), das be-
30 einer Beschleunigungsspannung von 25 kV betrieben wird, unter-
sucht.

Ergebnisse der Vergleichsversuche

35 Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Rasterelektronenmikro-
skopie ist in den Figuren 3 bis 5 dargestellt.

Die Ergebnisse der Vergleichsversuche für die Gruppen 1, 2 und 3 zeigen, daß die Endothelzelladhäsion und -retention auf erfindungsgemäß vorbeschichteten PTFE-Gefäßprothesen nach erfolgter Besiedlung (Fig. 3a, 4a, 5a) und Perfusion (Fig. 3b, 4b, 5b) in einem künstlichen Strömungskreislauf gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten unbeschichteten und beschichteten PTFE-Gefäßprothesen erheblich gesteigert und verbessert werden.

10 Zelladhäsion und -retention auf den Transplantaten vor und nach der Perfusion

15 Gruppe 1: In unbeschichteten PTFE-Gefäßsystemen waren 30 Minuten nach der Zellbesiedlung von $1,2 \times 10^5$ AHSVEC / cm^2 $14,9 \% \pm 3,1 \%$ der Fläche mit Endothelzellen bedeckt. Nach der Perfusion betrug die Endothelzelladhäsion $2,0 \% \pm 1,0 \%$. Die Zellretention betrug $13,9 \% \pm 7,9 \%$ (siehe Figuren 6 und 7).

20 Gruppe 2: Durch die Vorbeschichtung von PTFE-Transplantaten mit Humanfibronektin ergab sich eine Endothelzelladhäsion nach der Endothelzellenbesiedlung von $26,0 \% \pm 3,3 \%$. Nach der Perfusion im künstlichen Stromkreislauf betrug die Endothelzelladhäsion $11,8 \% \pm 1,6 \%$. Die berechnete Zellretention betrug $45,5 \% \pm 2,1 \%$. Sowohl die Endothelzelladhäsion als auch die -retention waren im Vergleich zu Gruppe 1 erheblich höher (siehe Figuren 6 und 7).

30 Gruppe 3: Bei den erfindungsgemäß vorbehandelten PTFE-Gefäßsystemen wurde eine Endothelzelladhäsion von $30,6 \% \pm 2,1 \%$ beobachtet. Die Perfusion der PTFE-Transplantate führte zu einer Endothelzelladhäsion von $19,3 \% \pm 2,8 \%$. Die Endothelzellretention betrug $62,9 \% \pm 7,5 \%$. Im Vergleich zu Gruppe 1 und Gruppe 2 (siehe Figuren 6 und 7) ergab sich somit eine weitere erhebliche Steigerung der Endothelzelladhäsion und -retention. Primär ist dieses bessere Ergebnis auf die erfindungsgemäße Vorbeschichtungstechnik zurückzuführen. In dem von Sank

35

et al. durchgeführten Verfahren werden die RGD-Peptide ohne Vorbeschichtung direkt auf das PTFE-Material aufgebracht. Weitere untergeordnete Unterschiede bestehen darin, daß Sank et al. ein anderes RGD-Peptid in einer geringeren Konzentration unter Verwendung von PTFE-Patch anstatt Rohrprothesen eingesetzt haben. Die geringere Peptidkonzentration und die Verwendung eines PTFE-Patch führen auch zu dem von Sank et al. festgestellten Ergebnis, daß eine Endothelzellenadhäsion auf RGD-Peptid beschichtetem PTFE geringfügig niedriger ist, als auf Fibronectin-beschichtetem PTFE. Die Ergebnisse bezüglich der Zelladhäsion der Gruppe 1 und 2 der beschriebenen Vergleichsversuche stehen im Gegensatz dazu.

Gruppe 4: Durch die Vorbeschichtung von PTFE-Transplantaten gemäß den erfindungsgemäßen Verfahrensschritten mit Polylysin/Glutardialdehyd (eine RGD enthaltende Substanz mit Zelladhäsion ist jedoch nicht vorhanden) ergab sich eine Endothelzelladhäsion nach der Endothelzellenbesiedlung von $10,5 \% \pm 1,1 \%$. Nach der Perfusion im künstlichen Stromkreislauf betrug die Endothelzelladhäsion $0,7 \% \pm 0,2 \%$. Die berechnete Zellretention betrug $6,6 \% \pm 1,5 \%$. Sowohl die Endothelzelladhäsion als auch die -retention waren im Vergleich zu Gruppe 3 erheblich niedriger (siehe Figuren 6 und 7).

Die verbesserten Ergebnisse bezüglich der Zelladhäsion und Zellretention der erfindungsgemäßen künstlichen Gefäßsysteme sind auf das Vorbeschichtungsverfahren der Erfindung zurückzuführen. In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden zwei Zwischenschritte angewandt, um die zelladhäsionsfördernde Substanz mit der Innenwand der Gefäßsystemoberfläche zu verbinden. Dies führt zu einer starken biochemischen Bindung der adhäsionsfördernden Substanz mit dem Transplantat und einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegenüber Scherspannung. Die adhäsionsfördernde Substanz wird über die noch verfügbare Aldehydgruppe der zweiten Komponente an die künstlichen Innenwände gebunden. Proteine und Peptide mit mindestens einer RGD-Sequenz werden

beispielsweise über primäre Aminogruppen an die zweite Beschichtungskomponente gebunden.

5 Der Vergleich der Gruppen 1, 2, 3 und 4 zeigt, daß die Gruppe 3, die den erfindungsgemäßen künstlichen Blutgefäßsystemen entspricht, eine höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber Scherspannung aufweist. Diese erhöhte Widerstandsfähigkeit wurde anhand des Ausmaßes der Endothelzelladhäsion und -retention nach der Perfusion in dem künstlichen Stromkreislauf ermittelt. Während
10 auf den mit RGD-Peptid-beschichteten erfindungsgemäßen Transplantaten 19,3 % \pm 2,8 % Endothelzelladhäsion nach der Perfusion festgestellt wurde, betrug diese bei Fibronectin-beschichteten Transplantaten nur 11,8 % \pm 1,6 %. Auf unbeschichteten Transplantaten betrug die Endothelzelladhäsion nach der Perfu-
15 sion 2,0 % \pm 1,0 %. Auf mit ausschließlich mit Polylysin/-Glutardialdehyd beschichteten Transplantaten betrug die Endothelzelladhäsion nach der Perfusion lediglich 0,7 % \pm 0,2 %.

Bei unbeschichteten Transplantaten waren nach einer einstündigen Scherspannung nur noch 13,9 % \pm 7,9 % der ursprünglich anhaftenden Endothelzellen vorhanden. Auf Fibronectin-beschichteten Transplantaten wurde eine Endothelzellretention von 45,5 % \pm 2,1 % gemessen. Auf mit ausschließlich mit Polylysin/-Glutardialdehyd beschichteten Transplantaten betrug die Endo-
20 thelzellretention 6,6 % \pm 1,5 %. Die bei weitem höchste Endothelzellretention von 62,9 % \pm 7,5 % zeigte sich wiederum bei PTFE-Transplantaten, die erfindungsgemäß vorbeschichtet waren.

Gegenüber dem Stand der Technik ist die Zelladhäsion und -re-
30 tention von Endothelzellen auf erfindungsgemäß beschichteten Gefäßsystemen erheblich erhöht. Die erfindungsgemäßen beschichteten Gefäßsysteme verringern bzw. vermeiden aufgrund ihrer verbesserten metabolischen Eigenschaften Störungen und Nebeneffekte, die beispielsweise durch Kontakt des zirkulierenden
35 Blutstromes mit dem Kunststoffmaterial entstehen. Die gegenüber dem Stand der Technik verbesserten metabolischen Eigenschaften

sind auf eine erhöhte Dichte der biologisch aktiven Substanzen, die die Zelladhäsion fördern, zurückzuführen. Die erfindungsgemäßen Gefäßsysteme ersetzen insbesondere in der Herz- und Gefäßchirurgie die natürlichen Gefäße im Herz- und Kreislaufsystem.

Beschreibung der Figuren

Figur 1: Schematische Darstellung biochemischer Reaktionen in erfindungsgemäßen Verfahren. Glutardialdehyd bindet sich über Aldehydfunktionen an die primäre Aminogruppe von Polylysin, mit welchem das PTFE-Material vorbeschichtet ist (a). Die verfügbaren Aldehydfunktionen des derivatisierten Polylysin können primäre Aminogruppen der synthetischen, adhäsionsfördernden RGD-Peptide (b) binden. Endothelzellen interagieren durch die Integrinfamilie von Zell-Matrix-Rezeptoren mit der an die Innenwand des Gefäßsystems gebundenen RGD-Sequenz und haften an dem PTFE-Transplantat (c) an.

Figur 2: Schematische Darstellung des künstlichen Stromkreislaufs. Kardiotomiebehälter (1) mit Luftblasenfilter (2), Perfusionmediumfilter (3), Wasserbad (4), extrakorporalem Perfusionsschlauch (5), Membranmeßwandler (6), Druck- und Temperaturmonitor (7), Glasrohr, welches das Transplantat umschließt, mit Ein- und Auslaß für das umgebende Medium (8), mit Zellen besiedeltes PTFE-Transplantat (9), Temperaturmeßwandler (10), Walzenpumpe (11), Durchströmungsnährmedium (12), Einlaß für CO₂-Einstellung (13), Einlaß für Nährmedium (14). Die Pfeile zeigen in die Flußrichtung.

Figur 3: Rasterelektronenmikrographie eines unbeschichtetes PTFE-Transplantats nach einer 30-minütigen Endothelzellenbesiedlung ($1,2 \times 10^5$ EC/cm²) (Fig. 3 a) und nach einer einstündigen Perfusion in einem Strömungskreislauf (100 ml/Min.) (Fig. 3 b). Ursprüngliche Vergrößerung x 618.

Figur 4: Rasterelektronenmikrographie eines mit Fibronectin-beschichteten PTFE-Transplantats nach 30 Minuten Endothelzellenbesiedlung ($1,2 \times 10^5$ EC/cm²) (Fig. 4 a) und nach einer einstündigen Perfusion in dem Strömungskreislauf (100 ml/Min.) (Fig. 4 b). Ursprüngliche Vergrößerung x 618.

Figur 5: Rasterelektronenmikrographie eines PTFE-Transplantats, das mit adhäsionsförderndem RGD-Peptid beschichtet ist, 30 Minuten nach Endothelzellenbesiedlung ($1,2 \times 10^5$ EC/cm²) (Fig. 5 a) und nach einer Stunde Perfusion in dem Strömungskreislauf (100 ml/Min.) (Fig. 5 b). Ursprüngliche Vergrößerung x 618.

Figur 6: Vergleich der Endothelzelladhäsion auf unbeschichteten, mit Fibronectin (HFN) beschichteten, mit Polylysin-/Glutardialdehyd (PL/GA; ohne RGD) und mit adhäsionsförderndem RGD-Peptid (RGD) beschichteten PTFE-Transplantaten. Die mit EC bedeckte Fläche (%) 30 Minuten nach Endothelzellenbesiedlung ($1,2 \times 10^5$ EC/cm²) und nach Perfusion in einem Flußkreislauf (100 ml/Min.). Berechnete Standardabweichung in Klammern.

Figur 7: Vergleich der EC-Retention (adhärente Zellen nach Perfusion / ursprüngliche adhärente Zellen nach der Besiedlung) auf unbeschichteten, mit Fibronectin (HFN) beschichteten, mit Polylysin/Glutardialdehyd (PL/GA; ohne RGD) und mit adhäsionsförderndem RGD-Peptid (RGD) beschichteten PTFE-Transplantaten. Berechnete Standardabweichung in Klammern.

Patentansprüche

1. Künstliches Blutgefäßsystem umfassend eine innere beschichtete Oberfläche, auf die eine Substanz mit Zelladhäsion aufgebracht ist,
dadurch gekennzeichnet, daß
5 die innere vorbeschichtete Oberfläche zwei miteinander umgesetzte Komponenten enthält, nämlich eine makromolekulare Komponente enthaltend mehr als eine primäre Aminogruppe und eine Komponente, die mindestens zwei reaktive Gruppen davon mindestens eine Aldehydgruppe aufweist und die Substanz mit Zelladhäsion ein Oligosaccharid, -peptid, oder
10 protein, insbesondere ein Peptid, Saccharid oder Protein mit mindestens einer RGD (Arginin-Glycin-Asparagin)-Aminosäuresequenz ist.
- 15 2. Künstliches Blutgefäßsystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
das künstliche Gefäßsystem aus einem synthetischen Material wie Polytetrafluorethylen (PTFE), Polyurethan, Silicon und dergleichen besteht.
- 20 3. Künstliches Blutgefäßsystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
das mindestens eine RGD (Arginin-Glycin-Asparagin)-Aminosäuresequenz enthaltende Protein, Saccharid oder Peptid
25 von Zellrezeptoren, insbesondere von Endothelzellrezeptoren gebunden wird.

4. Künstliches Blutgefäßsystem nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
die primären Aminogruppen der ersten makromolekularen Kom-
ponente der beschichteten inneren Oberfläche in Seitenket-
ten angeordnet sind.
5. Künstliches Blutgefäßsystem nach einem der Ansprüche 1 und
4,
dadurch gekennzeichnet, daß
in der Oberflächenbeschichtung die erste makromolekulare
Komponente Poly-lysin-hydrohalogenid, vorzugsweise ein
Poly-L-lysin-hydrohalogenid und insbesondere Poly-L-
hydrobromid, ist.
6. Künstliches Blutgefäßsystem nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
in der Oberflächenbeschichtung die zweite Komponente
Glutardialdehyd ist.
7. Verfahren zur Herstellung eines künstlichen Gefäßsystems,
bestehend aus einem synthetischen Material, indem die
innere Oberfläche vorbeschichtet wird und anschließend
eine Substanz aufgebracht wird, die von Zelladhäsions-
rezeptoren erkannt und gebunden wird,
gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
- a) das künstliche Gefäßsystem wird mit einer ersten
makromolekularen Komponente beschichtet, die mehr als
eine primäre Aminogruppe enthält
- b) die primäre Aminogruppen enthaltende makromolekulare
Komponente wird mit einer zweiten Komponente umge-
setzt, die mindestens zwei reaktive Gruppen, davon
mindestens eine Aldehydgruppe, enthält

- c) das durch die Schritte a) und b) vorbeschichtet.
künstliche Gefäßsystem wird mit einem Oligosaccharid,
-peptid, oder -protein, insbesondere einem Peptid
5 Saccharid oder Protein, das mindestens eine RGI
(Arginin-Glycin-Asparagin)-Aminosäuresequenz auf
weist, umgesetzt.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
10 dadurch gekennzeichnet, daß
das künstliche Gefäßsystem aus einem synthetischen Mate
rial wie Polytetrafluorethylen (PTFE), Polyurethan,
Silicon und dergleichen besteht.
- 15 9. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet, daß
die primären Aminogruppen der makromolekularen Komponente
des Verfahrensschrittes a) in Seitenketten angeordne
sind.
- 20 10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet, daß
die makromolekulare Komponente ein Poly-lysin-hydrohalo
genid, vorzugsweise ein Poly-L-lysin-hydrohalogenid un
25 insbesondere Poly-L-lysin-hydrobromid, ist.
11. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet, daß
die makromolekulare Komponente mit Glutardialdehyd a)
30 zweite Komponente im Verfahrensschritt b) umgesetzt wird
wobei die zweite Komponente in einer molaren Menge ein
gesetzt wird, die geeignet ist, sämtliche NH_2 -Gruppen der
ersten Komponente zu funktionalisieren.
- 35 12. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet, daß

das mindestens eine RGD-Sequenz enthaltende Protein, Saccharid oder Peptid von Zellrezeptoren, insbesondere von Endothelzellrezeptoren gebunden wird.

2/7

Figur 2

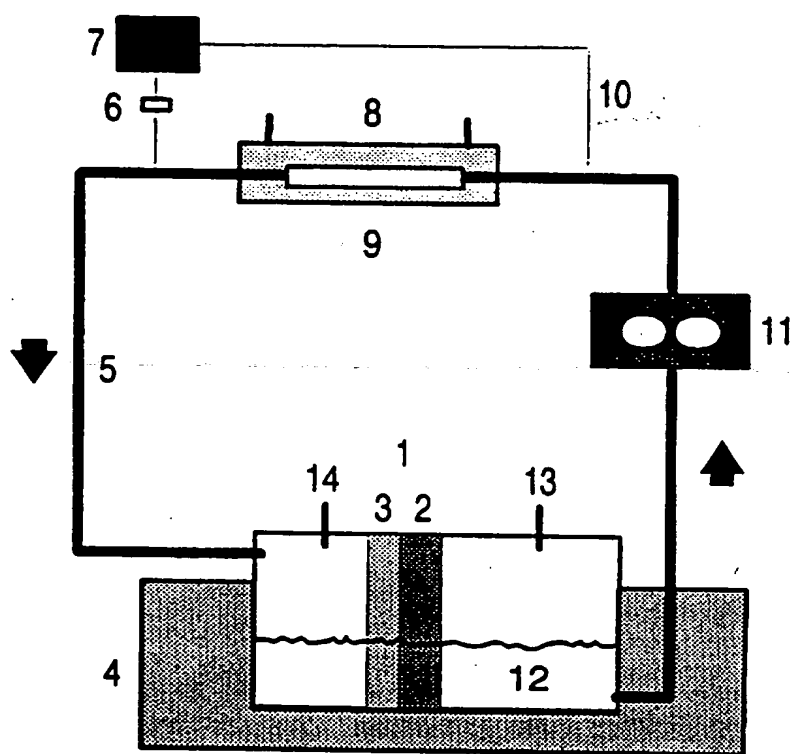


Fig. 3 A



Fig. 3 B



4/7

Fig. 4A



Fig. 4B



Fig. 5A

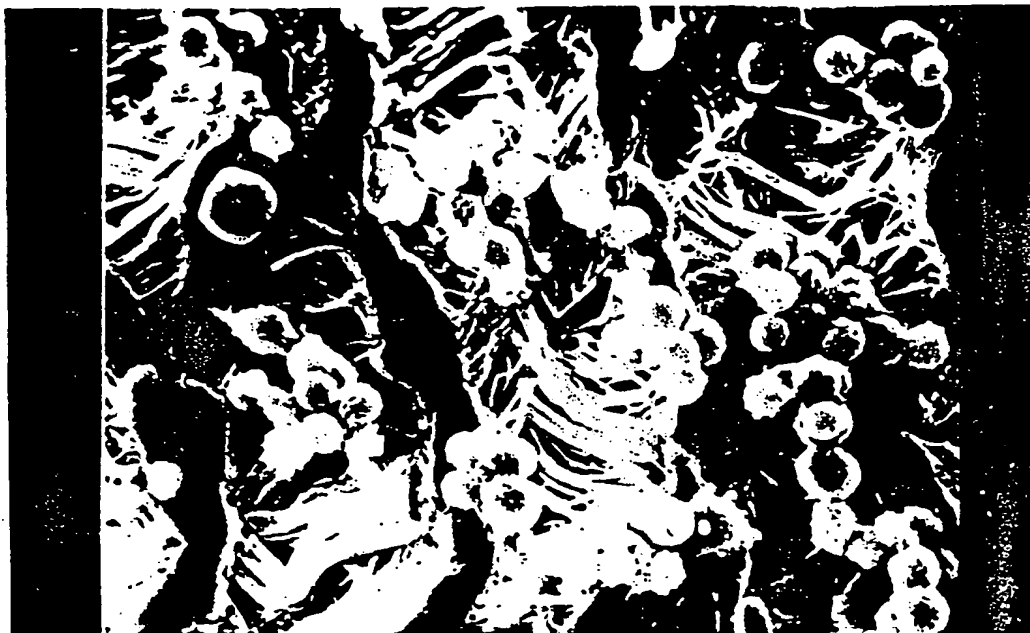
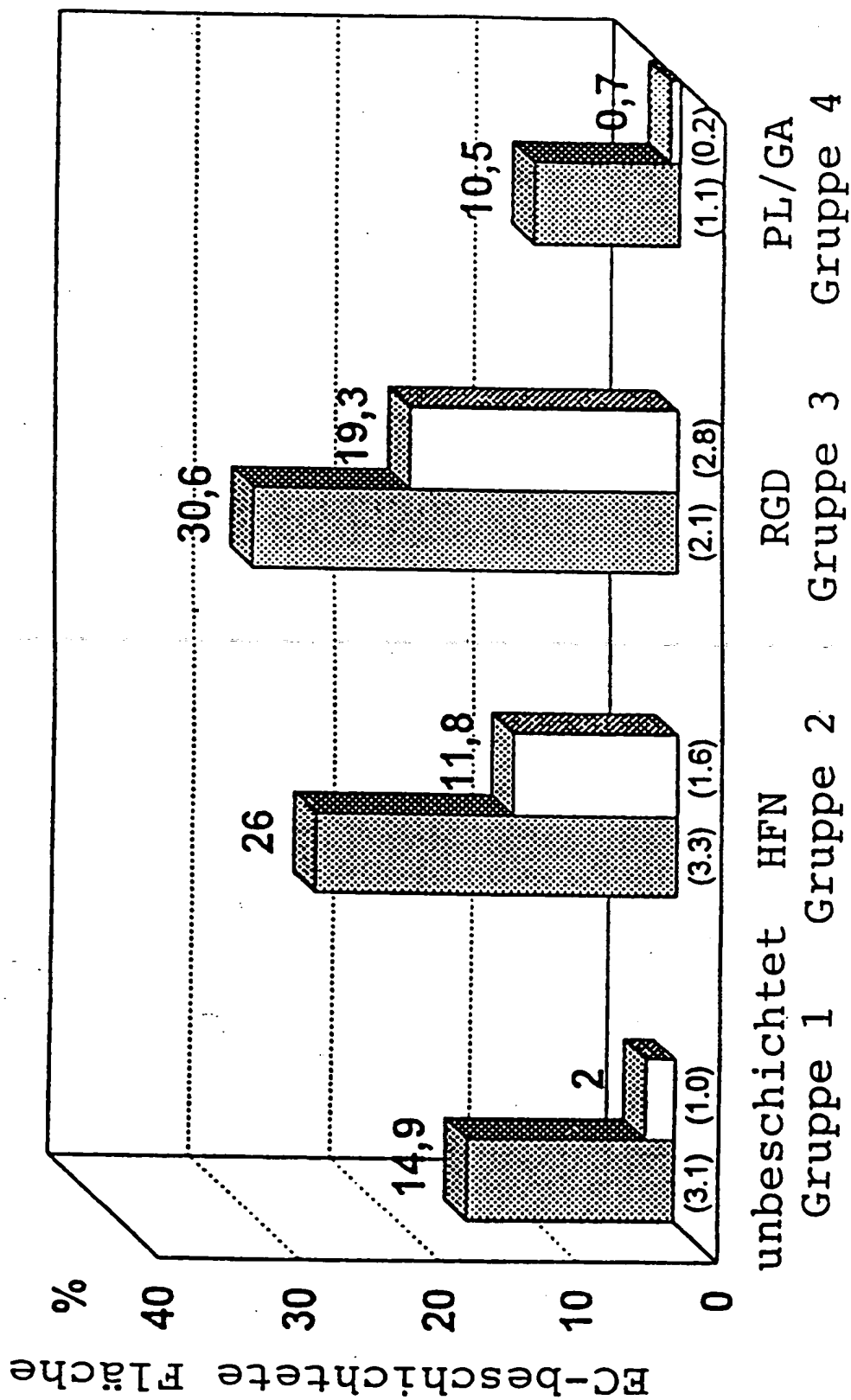


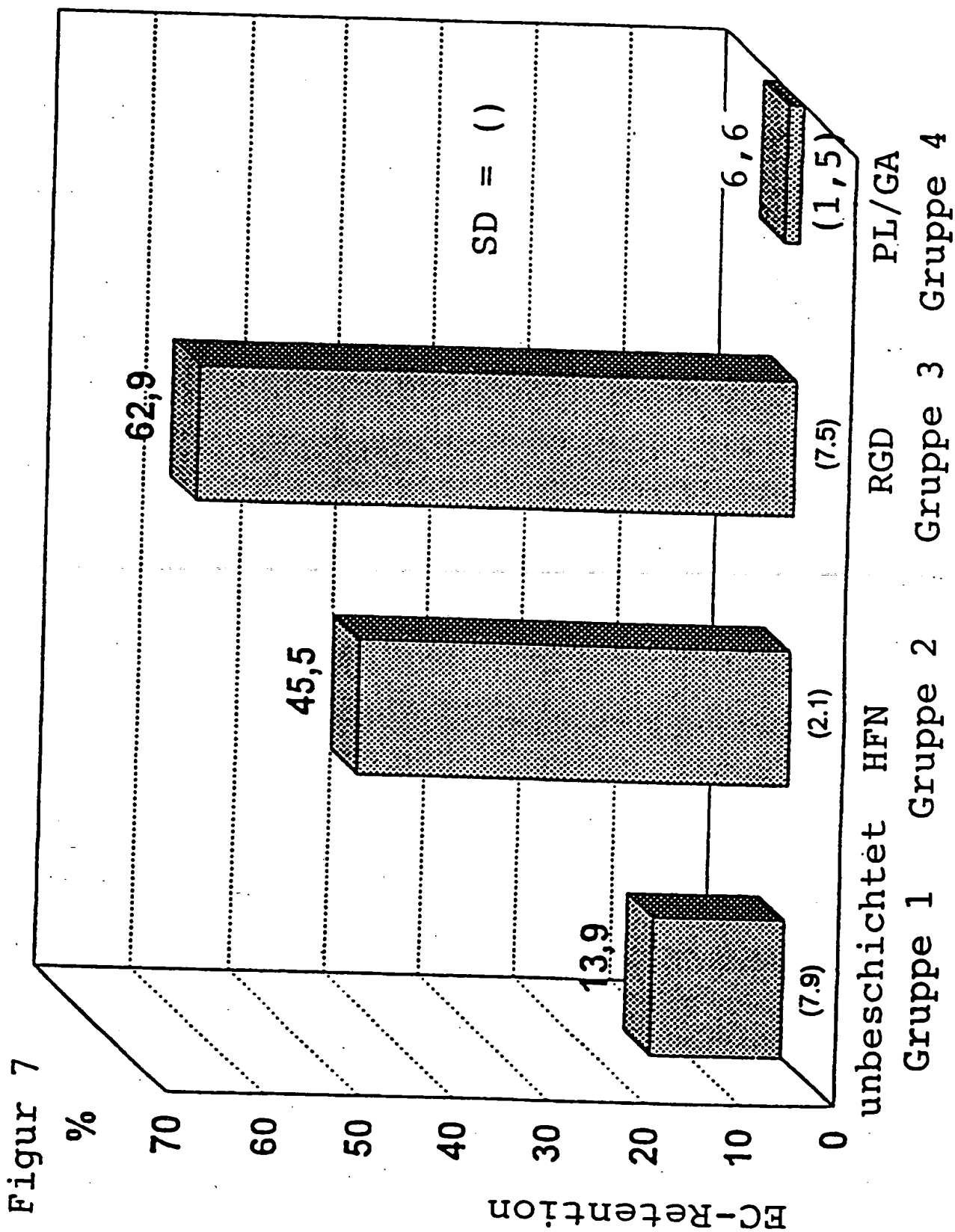
Fig. 5B



Figur 6



SD = ()



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT, EP 96/00608

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,90 11297 (JOLLA CANCER RES FOUND) 4 October 1990 see page 1, line 25 - page 2, line 16 ---	1-12
Y	WO,A,91 05036 (UNIV TEXAS) 18 April 1991 see page 1, line 19 - line 31 see page 12, line 19 - page 13, line 16 see page 15, line 7 - line 24 see page 16, line 13 - page 17, line 9 see page 25, line 1 - line 10 see page 26, line 14 - line 32 see claims ---	1-12
Y	WO,A,91 03990 (CHIRON OPHTHALMICS INC) 4 April 1991 see page 6, line 3 - line 7 see claims; examples 1-3 ---	1-12

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 July 1996

Date of mailing of the international search report

18.07.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Cousins-Van Steen, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT, EP 96/00608

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EP,A,Ø 531 547 (VASCULAR GRAFT RESEARCH CENTER) 17 March 1993</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT, EP 96/00608

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9011297	04-10-90	US-A- 5120829	09-06-92
		AT-T- 109161	15-08-94
		CA-A- 2046631	21-09-90
		DE-D- 69011102	01-09-94
		DE-T- 69011102	24-11-94
		EP-A- 0464140	08-01-92
		ES-T- 2057553	16-10-94
		JP-T- 4506511	12-11-92
WO-A-9105036	18-04-91	US-A- 5278063	11-01-94
		US-A- 5330911	19-07-94
		AU-B- 646644	03-03-94
		AU-B- 6447290	28-04-91
		CA-A- 2066213	29-03-91
		EP-A- 0494216	15-07-92
		JP-T- 5502998	27-05-93
WO-A-9103990	04-04-91	AU-B- 6510190	18-04-91
		CA-A- 2066660	16-03-91
		EP-A- 0491860	01-07-92
		JP-T- 5501971	15-04-93
EP-A-0531547	17-03-93	AU-B- 652236	18-08-94
		AU-B- 1447092	02-11-92
		CA-A- 2084057	30-09-92
		JP-A- 5269198	19-10-93
		WO-A- 9217218	15-10-92

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT, EP 96/00608

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61L27/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,90 11297 (JOLLA CANCER RES FOUND) 4.Oktober 1990 siehe Seite 1, Zeile 25 - Seite 2, Zeile 16 ---	1-12
Y	WO,A,91 05036 (UNIV TEXAS) 18.April 1991 siehe Seite 1, Zeile 19 - Zeile 31 siehe Seite 12, Zeile 19 - Seite 13, Zeile 16 siehe Seite 15, Zeile 7 - Zeile 24 siehe Seite 16, Zeile 13 - Seite 17, Zeile 9 siehe Seite 25, Zeile 1 - Zeile 10 siehe Seite 26, Zeile 14 - Zeile 32 siehe Ansprüche --- -/-	1-12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

M Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9.Juli 1996

Abenddatum des internationalen Recherchenberichts

18.07.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Cousins-Van Steen, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT, EP 96/00608

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9011297	04-10-90	US-A- 5120829	09-06-92
		AT-T- 109161	15-08-94
		CA-A- 2046631	21-09-90
		DE-D- 69011102	01-09-94
		DE-T- 69011102	24-11-94
		EP-A- 0464140	08-01-92
		ES-T- 2057553	16-10-94
		JP-T- 4506511	12-11-92
WO-A-9105036	18-04-91	US-A- 5278063	11-01-94
		US-A- 5330911	19-07-94
		AU-B- 646644	03-03-94
		AU-B- 6447290	28-04-91
		CA-A- 2066213	29-03-91
		EP-A- 0494216	15-07-92
		JP-T- 5502998	27-05-93
WO-A-9103990	04-04-91	AU-B- 6510190	18-04-91
		CA-A- 2066660	16-03-91
		EP-A- 0491860	01-07-92
		JP-T- 5501971	15-04-93
EP-A-0531547	17-03-93	AU-B- 652236	18-08-94
		AU-B- 1447092	02-11-92
		CA-A- 2084057	30-09-92
		JP-A- 5269198	19-10-93
		WO-A- 9217218	15-10-92

Abstract

WO 9625185 A UPAB: 19961025

In a synthetic vascular system comprising an inner coated surface onto which a cpd. (I) with cell adhesion properties is applied, the new features are: (1) that the inner, precoated surface contains 2 reacted components: (i) a macromolecule (II) contg. more than one prim. amino gp. and (ii) the other (III) with 2 reactive gps., 1 being aldehyde, and (2) that (I) is an oligosaccharide, peptide or protein, esp. one contg. 1 Arg-Gly-Asp (RGD) sequence.

USE - The system is esp. used to replace arteries, partic. in cardiac and vascular surgery.

ADVANTAGE - The system provides better adhesion and retention of cells, esp. endothelial cells, than known synthetic vessels. It ensures trouble-free blood flow (reduced risk of thrombosis or occlusion) and has improved metabolic properties. (III) becomes attached to regularly spaced aldehyde gps. (not randomly), resulting in a stable, high density coating.

Dwg.6/7